



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>A61K 39/395, G01N 33/15 // C07K</b> <b>16/28, C12N 15/06, C12P 21/08, (C12P</b> <b>21/08, C12R 1:91)</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO97/32601</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1997年9月12日(12.09.97)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP97/00702 <b>(22) 国際出願日</b> 1997年3月6日(06.03.97) <b>(30) 優先権データ</b> 特願平8/78182 1996年3月6日(06.03.96) <b>JP</b> <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) <b>(72) 発明者; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 福島 直(FUKUSHIMA, Naoshi)[JP/JP] 〒412 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 須藤政彦(SUDO, Masahiko) 〒103 東京都中央区日本橋室町1丁目13番4号 ムロマチ齋藤ビル4階 Tokyo, (JP)		<b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書
<b>(54)Title: METHOD OF SCREENING APOPTOSIS INDUCING SUBSTANCES</b>  <b>(54)発明の名称</b> アポトーシスを誘起する物質のスクリーニング方法  <b>(57) Abstract</b> A method of screening apoptosis inducing substances characterized by using cells where an integrin-associated protein (IAP) has been expressed; the above screening method wherein the cells used are myelocytic cells; and pharmaceutical compositions containing as the active ingredient the substances obtained by the above method. The invention makes it possible to differentiate, identify and screen readily and highly efficiently the substances, such as antibodies, that induce apoptosis in myelocytic cells by using cells wherein IAP has been expressed while utilizing specific binding reactions of the substances. The above-specified substances thus obtained can be used by virtue of their characteristics as the active ingredient of pharmaceutical compositions such as anticancer agents and remedies for myelocytic leukemia.		

## (57) 要約

アポトーシスを誘起する物質のスクリーニング方法等を提供する。IAP (Integrin Associated Protein) を発現している細胞を用いてアポトーシス (apoptosis) を誘起する性質を有する物質を探索することを特徴とするアポトーシスを誘起する物質のスクリーニング方法。細胞が、骨髓球様細胞である上記のスクリーニング方法。上記スクリーニング方法で得られる物質を有効成分としてなる医薬組成物。本発明は、IAPを発現している細胞を用いることにより、骨髓球様細胞にアポトーシスを引き起こす抗体等の物質を、その特異的結合反応を利用して、それらを識別、同定し、簡便かつ高効率でスクリーニングすることを可能とする。本発明のスクリーニング方法により取得された骨髓球様細胞等にアポトーシスを引き起こす作用を有する物質は、その特性を利用して、抗ガン剤、骨髓性白血病の治療等の分野において有用な骨髓性白血病治療薬剤等の医薬組成物の有効成分として使用し得るものである。

## 情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	EE	エストニア	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BB	バハマ	GE	ジョージア	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MC	モナコ	SK	スロバキア
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	HE	ハンガリー	MK	マケドニア	TD	チャド
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CC	ココス諸島	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CI	コートジボワール	KE	ケニア	MX	メキシコ	TA	タリク
CM	カメルーン	KR	韓国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	米国
CO	コロンビア	KZ	カザフスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア

## 明細書

## アポトーシスを誘起する物質のスクリーニング方法

## 5 技術分野

本発明は、アポトーシス (a p o p t o s i s) を誘起する物質のスクリーニング方法等に関するものであり、更に詳しくは、I A P (I n t e g r i n A s s o c i a t e d P r o t e i n) を発現している細胞を用いて、骨髓球様細胞等にアポトーシスを誘起する性質を有するモノクローナル抗体等の物質を、簡便かつ高効率で探索することを可能とする新しいアポトーシスを誘起する物質のスクリーニング方法、並びに、当該スクリーニング方法で得られるアポトーシスを誘起する物質、当該物質を有効成分としてなる医薬組成物、I A P に結合能を有するアポトーシスを誘起する物質、  
15 当該物質を有効成分としてなる医薬組成物等に関するものである。

## 背景技術

従来、顆粒球コロニー刺激因子、例えば、遺伝子組換え型顆粒球コロニー刺激因子 (r G - C S F) は、主に顆粒球系細胞の分化、  
20 増殖を促進させる液性因子として知られているものであるが、マウスの i n v i v o の実験では、この r G - C S F を投与することにより、骨髓の造血亢進のみならず、脾臓でも著しい髄外造血が起こり造血幹細胞を始めとしてすべての造血前駆細胞が脾臓で増殖することが報告されている。そして、この脾臓での髄外造血のメカニ  
25 ズムとして、r G - C S F の刺激により脾臓の造血微小環境が変化し、造血支持能力が亢進したことにより造血が生じたものであると考えられた。

そこで、本発明者は、この脾臓での造血機能を解明するために、r G - C S F 連投後の脾臓の間質細胞に着目し、間質細胞を介した

rG-CSFによる造血機能亢進の解析を試みるべく、rG-CSFを連投したマウス脾臓より造血間質細胞株(CF-1細胞)を樹立し、かかる造血間質細胞を用いてその造血支持能を検討したところ、*in vitro*でのコロニー刺激活性および*in vivo*での造血幹細胞支持能が認められた〔Blood, 80, 1914 (1992)〕。

しかしながら、この脾臓間質細胞については、その一部が細胞株（CF-1細胞）として樹立されて、その細胞学的特性の検討等なされているものの、これまでに、その細胞表面抗原を認識する特定の抗体を作製することはほとんど行われておらず、ましてやその特性等については全く知られていない状況にあった。

そこで、本発明者は、脾臓間質細胞に関する前記したような知見とこれまでの研究成果を踏まえ、この脾臓間質細胞を識別し得る特定の抗体を開発することを目標として鋭意研究を積み重ねる中で、  
15 当該脾臓間質細胞株を感作抗原として使用してモノクローナル抗体を作製したところ、これまでに報告された例のない新規モノクローナル抗体が得られた。

そして、この取得されたモノクローナル抗体の特性について検討したところ、当該モノクローナル抗体は、骨髄球様細胞にアポトーシスを誘起する特性を有するものであることを見い出し、既に報告したが、更に、当該モノクローナル抗体が認識する抗原は、IAP (Integrin Associated Protein) と同一であること、また、IAPはアポトーシスに関する機能を有することを見い出すと共に、IAPを発現している細胞を用いることによりアポトーシスを誘起する抗体等の物質を識別、同定し、スクリーニングすることが可能であるとの知見を得て、鋭意研究を積み重ねる中で、本発明を完成するに至った。

## 発明の要約

本発明は、アポトーシスを誘起する物質のスクリーニング方法等を提供することを目的とする。

本発明は、IAP (Integrin Associated Protein) を発現している細胞を用いてアポトーシス (apoptosis) を誘起する性質を有する物質を探索することを特徴とするアポトーシスを誘起する物質のスクリーニング方法。細胞が、骨髓球様細胞である上記のスクリーニング方法。上記スクリーニング方法で得られる物質を有効成分としてなる医薬組成物、である。

- 10 本発明は、IAPを発現している細胞を用いることにより、骨髓球様細胞にアポトーシスを引き起こす抗体等の物質を、その特異的結合反応を利用して、それらを識別、同定し、簡便かつ高効率でスクリーニングすることを可能とする。本発明のスクリーニング方法により取得された骨髓球様細胞等にアポトーシスを引き起こす作用
- 15 を有する物質は、その特性を利用して、抗ガン剤、骨髓性白血病の治療等の分野において有用な骨髓性白血病治療薬剤等の医薬組成物の有効成分として使用し得るものである。

#### 発明の開示

- 20 すなわち、本発明は、IAPを発現している細胞を用いてアポトーシス (apoptosis) を誘起する性質を有する物質をスクリーニングする方法を提供することを目的とするものであり、更には、当該スクリーニング方法により取得された細胞にアポトーシスを誘起する新しい物質、当該物質を有効成分としてなる医薬組成物
- 25 等を提供することを目的とするものである。

前記のモノクローナル抗体は、骨髓球様細胞 (myeloid cell) のアポトーシス (apoptosis) (核クロマチンDNAがヌクレオソーム単位で切断 (いわゆるラダー・フォーメーション) されること等) を特徴とし、その結果、細胞を死に至らしめ

る現象で、細胞自滅とも云う）を引き起こす抗原等を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定する機能を有するものとして、あるいは骨髓球様細胞にアポトーシスを誘起させる機能を有するものとして極めて有用なものである。尚、骨髓球様細胞には、リンパ球以外の細胞、例えば、好中球、巨核球、骨髓芽球、骨髓球、肥満細胞、マクロファージ、単球、赤芽球が含まれるが、本発明で云う骨髓球様細胞もこれと同義のものを意味する。従来、一般に、骨髓球様細胞にアポトーシスを誘起する特性を有するモノクローナル抗体は前記の他に全く知られておらず、従って、前記モノクローナル抗体は、骨髓球様細胞にアポトーシスを誘起する特性を有するすべてのモノクローナル抗体を包括するものとして定義される。

かかるモノクローナル抗体は、基本的には、例えば、次のようにして作製することができる。

すなわち、前記モノクローナル抗体は、例えば、r G - C S F 投与動物の脾臓間質細胞を感作抗原として使用して、基本的には、これを通常の免疫法を応用して免疫し、通常の細胞融合法を応用して細胞融合させ、通常のクローン化法を応用してクローン化することによって作製することができる。

前記モノクローナル抗体の作製方法は、より具体的には、例えば、前記感作抗原として、本発明者らによって培養細胞株として樹立された r G - C S F 投与マウスの脾臓間質細胞である C F - 1 細胞〔B l o o d, V o l. 8 0, 1 9 1 4 ( 1 9 9 2 ) 〕を使用し、当該感作抗原で免疫した哺乳動物の形質細胞（免疫細胞）を、マウス等の哺乳動物のミエローマ細胞と融合させ、得られた融合細胞（ハイブリドーマ）をクローン化し、その中から前記細胞株を認識する前記抗体を産生するクローンを選別し、これを培養して目的とする抗体を回収する方法が好適なものとして例示される。しかしながら、かかる方法はあくまで一例に過ぎず、例えば、この場合、前記感作抗原としては、前記 C F - 1 細胞に限らず、C F - 1 細胞の場

合に準じて得られるヒト脾臓間質細胞由来の細胞株を使用することも適宜可能であり、前記CF-1細胞の場合と同様にして目的とするヒト骨髓球様細胞と結合するモノクローナル抗体を作製することができる。

5      このようなモノクローナル抗体の作製方法において、前記感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用するミエローマ細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、マウス、ラット、ハムスター等が好適なものとして使用される。

10      次に、免疫は、一般的方法により、例えば、前記CF-1細胞等の脾臓間質細胞を哺乳動物に腹腔内注射等により投与することにより、行われる。より具体的には、PBSや生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを、動物に1ヶ月毎に数回投与することが好ましい。免疫細胞としては、前記細胞株の最終投与後に摘出した脾細胞  
15      胞を使用するのが好ましい。

次に、前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞としては、すでに公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3X63Ag8.653) [J. Immunol., 123, 1548 (1978)]、p3-U1 [Current Topics in Microbiology and Immunology, 81, 1-7 (1978)]、NS-1 [Eur. J. Immunol., 6, 511-519 (1976)]、MPC-11 [Cell, 8, 405-415 (1976)]、Sp2/0-Ag14 [Nature, 276, 269-270 (1978)]、FO [J. Immunol. Meth., 35, 1-21 (1980)]、S194 [J. Exp. Med., 148, 313-323 (1978)]、およびR210 [Nature, 277, 131-133 (1979)]等が好適に使用される。  
25

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には通常

の方法、例えば、ミルシュタインら (M i l s t e i n e t a l . ) の方法 [M e t h o d s E n z y m o l . , 7 3 , 3 - 4 6 ( 1 9 8 1 ) ] 等に準じて行うことができる。

- より具体的には、前記細胞融合は、例えば、融合促進剤の存在下  
5 に通常の栄養培地中で実施される。融合促進剤としては、例えば、  
ポリエチレングリコール (P E G)、センダイウイルス (H V J)  
等が使用され、更に、所望により融合効率を高めるためにジメチル  
スルホキシド等の補助剤を適宜添加使用することもできる。免疫細胞  
とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対  
10 して、免疫細胞を 1 ~ 1 0 倍程度とするのが好ましい。また、前記  
細胞融合に用いる培地としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の  
増殖に好適な R P M I - 1 6 4 0 培地、M E M 培地、その他、この  
種の細胞培養に使用される通常の培地が使用可能であり、更に、牛  
胎児血清 (F B S) 等の血清補液を併用することも可能である。
- 15 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培  
地内でよく混合し、予め 3 7 °C 程度に加温した P E G 溶液、例えば  
、平均分子量 1 , 0 0 0 ~ 6 , 0 0 0 程度の P E G を、通常、培地  
に約 3 0 ~ 6 0 % (W / V) の濃度で添加し、混合することによっ  
て行われる。続いて、適当な培地を逐次添加し、遠心して上清を除  
20 去する操作を繰り返すことにより目的とするハイブリドーマが形成  
される。

- 当該ハイブリドーマは、通常、選択培地、例えば、H A T 培地 (   
ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培地) で培  
養することにより選択される。当該 H A T 培地による培養は、目的  
25 とするハイブリドーマ以外の細胞 (未融合細胞) が死滅するのに充  
分な時間、通常、数日 ~ 数週間継続する。次いで、通常の限界希釈  
法に従って、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリー  
ニングおよび単一クローン化が実施される。

このようにして作製される前記モノクローナル抗体を産生するハ

イブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマから前記モノクローナル抗体を採取するには、当該ハイブリドーマを常法に従って培養し、その培養上清から得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳動物に  
5 投与して増殖させその腹水から得る方法など適宜の方法が採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適した方法であり、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適した方法である。

更に、前記した方法により得られる抗体は、塩析法、ゲル濾過法  
10 、アフィニティークロマトグラフィー等の通常の精製手段を応用して高純度に精製することができる。

当該モノクローナル抗体は、後記する実施例においてはBMAP-1を用いたが、それに限らず、実施例において具体的に示す固有の特性、すなわち骨髄球様細胞等にアポトーシスを誘起する機能を  
15 有するものであれば、如何なるものであってもよく、当該機能を有するものであれば、その種類を問わず利用することができる。次に、IAPを発現している細胞としては、骨髄球様細胞等が例示されるが、例えば、マウスIAP遺伝子(Genbank, Accession number Z25524)〔The Journal of Cell Biology, 123, 485-496 (1993)〕を  
20 常法により導入したジャーカット細胞(Transfected Jurkat Cell)等が好適なものとして使用される。IAP遺伝子としては、マウスIAP遺伝子に限定されるものではなく、他のIAP遺伝子、例えば、ヒトIAP遺伝子等を使用することが可能である。その他、IAPを発現している細胞(例えば、ヒト  
25 ト白血病細胞等)であれば同様に使用できることは言うまでもない。

そして、本発明に係るスクリーニング方法は、IAPを発現している細胞を用いる点に最大の特徴を有するものであり、当該細胞を用いてアポトーシスを誘起する物質をスクリーニングする方法は、

I A Pを発現して無い同一細胞をブランクとして、当該I A Pを抗原として特異的に認識するモノクローナル抗体、その断片等の物質を、常法により識別、同定して、スクリーニングすれば良く、その具体的方法は特に限定されるものではない。

5 本発明のスクリーニング方法により取得されたモノクローナル抗体、その断片、I A Pに結合能を有するアポトーシスを誘起する物質等は、その特性を利用して、例えば、抗ガン剤、骨髄性白血病の治療等の分野において有用な骨髄性白血病治療薬剤等の医薬組成物の有効成分として使用し得るものである。

10 このようなモノクローナル抗体を利用して骨髄球様細胞にアポトーシスを引き起こす抗原等を特異的に認識する抗体として、これらを識別、同定するための、あるいは、当該モノクローナル抗体の固有の特性を利用して抗ガン剤、骨髄性白血病治療薬剤等の医薬組成物として使用するための具体的システムの構築、その改変および応  
15 用等は、当業者にとって自明の通常の方法を応用して実施されるものであることは云うまでもない。

#### 図面の簡単な説明

図1は、イムノフルオレッセンスによる解析（抗体非存在下の対  
20 照，C F - 1細胞）を示す。

図2は、イムノフルオレッセンスによるG S P S T - 1抗体とC F - 1細胞との結合性の解析を示す。

図3は、イムノフルオレッセンスによるB M A P - 1抗体とC F - 1細胞との結合性の解析を示す。

25 図4は、イムノフルオレッセンスによる解析（抗体非存在下の対照，骨髄細胞）を示す。

図5は、イムノフルオレッセンスによるG S P S T - 1抗体と骨髄細胞との結合性の解析を示す。

図6は、イムノフルオレッセンスによるB M A P - 1抗体と骨

髓細胞との結合性の解析を示す。

図 7 は、イムノフルオレッセンスによる解析（抗体非存在下の対照，NFS-60）を示す。

図 8 は、イムノフルオレッセンスによる GSPST-1 と NFS-60 細胞との結合性を示す。

図 9 は、イムノフルオレッセンスによる解析（ラット IgG1 による対照，NFS-60）を示す。

図 10 は、イムノフルオレッセンスによる BMAP-1 と NFS-60 細胞との結合性を示す。

図 11 は、モノクローナル抗体の細胞増殖抑制試験（BMAP-1）を示す。

図 12 は、モノクローナル抗体の骨髄移植阻害試験（GSPST-1）を示す。

図 13 は、モノクローナル抗体の骨髄移植阻害試験（BMAP-1）を示す。

図 14 は、本発明のモノクローナル抗体の BMAP-1 投与 6 日後の死滅した骨髄細胞（2）、抗体非存在下の対照（1）、を示す説明図である〔骨髄標本（生物の形態）の顕微鏡写真（H. E. 染色）（×400）〕を示す。

図 15 は、本発明のモノクローナル抗体の BMAP-1 を投与した場合にみられる骨髄細胞の DNA のラダー・フォーメーションを示す説明図である（電気泳動クロマトグラフィーの泳動写真）を示す。

図 16 は、TNF による細胞障害試験を示す。

図 17 は、モノクローナル抗体の細胞障害試験（BMAP-1）を示す。

図 18 は、イムノフルオレッセンスによる解析（ラット IgG2a による対照，BWV1）を示す。

図 19 は、イムノフルオレッセンスによる抗マウス MHC c1

a s s I 抗体と B W V 1 細胞との結合性を示す。

図 2 0 は、イムノフルオレッセンスによる解析（ラット I g G 1 による対照，B W V 1）を示す。

図 2 1 は、イムノフルオレッセンスによる B M A P - 1 と B W V 1 細胞との結合性を示す。

図 2 2 は、B M A P - 1 の細胞（マウス I A P 遺伝子を導入したジャーカット細胞）に対する増殖抑制作用を示す。

図 2 3 は、A p o p t o s i s の解析 —— 発現 V e c t o r のみを導入した J u r k a t c e l l s に対する作用（I g G 1 1  $\mu$ g / m l , A : A p o p t o s i s r a t i o , 6 . 2 % ）を示す。

図 2 4 は、A p o p t o s i s の解析 —— 発現 V e c t o r のみを導入した J u r k a t c e l l s に対する B M A P - 1 の作用（B M A P - 1 1  $\mu$ g / m l , A : A p o p t o s i s r a t i o , 3 . 5 % ）を示す。

図 2 5 は、A p o p t o s i s の解析 —— マウス I A P 遺伝子を導入した J u r k a t c e l l s に対する作用（I g G 1 1  $\mu$ g / m l , A : A p o p t o s i s r a t i o , 3 . 2 % ）を示す。

図 2 6 は、A p o p t o s i s の解析 —— マウス I A P 遺伝子を導入した J u r k a t c e l l s に対する B M A P - 1 の作用（B M A P - 1 1  $\mu$ g / m l , A : A p o p t o s i s r a t i o , 2 5 . 6 % ）を示す。

## 25 符号の説明

- a B M A P - 1 投与したマウス胸腺の D N A （ 2 4 時間）
- b B M A P - 1 投与したマウス骨髓の D N A （ 2 4 時間）
- c B M A P - 1 投与したマウス骨髓の D N A （ 8 時間）
- d B M A P - 1 投与したマウス骨髓の D N A （ 4 時間）

- e 無処理マウスの骨髄のDNA（骨髄細胞）
- f 分子量マーカー

### 発明を実施するための最良の形態

- 5 次に、本発明を参考例および実施例に基づいて更に具体的に説明するが、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

#### 参考例

##### 脾臓間質細胞株の樹立とその性質

##### 1) 脾臓間質細胞株の樹立

- 10 rG-CSF連続投与による脾臓間質細胞株は、rG-CSF 100  $\mu$ g/kgを5日間投与したC57BL/6Jマウスの脾臓細胞の初代培養から樹立された。すなわち、rG-CSF投与後に無菌条件下に脾臓を摘出し、25 cm<sup>2</sup> プラスチック・フラスコ（Corning社製）で6週間培養し、10%非働化血清（FBS）
- 15 （三光純薬社製、東京）、100 U/mlペニシリンおよび100  $\mu$ g/mlストレプトマイシンを添加したIscoveの改変Dulbecco培地（IMDM）（Boehringer-Mannheim社製）で37℃、5%CO<sub>2</sub>のインキュベータ内で培養し、週2回新鮮培地に交換した。
- 20 コンフルエント培養から0.05%トリプシン+0.02%EDTA（Sigma Chemical社製）、Ca-Mg-free PBSを用いて付着性細胞集団（間質細胞）を分取して別なフラスコに移した。この継代培養を週に約1～2回繰り返した。初期の継代培養（1～10回目）での細胞のsplit ratioは
- 25 1/4～1/8であったが、その後の比率は1/16～1/32とした。約10回目の継代培養後に間質細胞は均質な線維芽細胞様となった。20回目の継代時に上述の方法で間質細胞を採集し、限界希釈法を用いて細胞のクローニングを2回繰返して間質細胞株（CF-1細胞株）を樹立した。

次いで、これらの細胞を10%非働化FBSを加えたIMDM 5 mlを入れた25 cm<sup>2</sup> フラスコ (Corning社製) 内で維持培養し、5日毎にsplit ratio 1/32で継代培養した。尚、他の哺乳動物についても、その脾臓間質細胞株を樹立することができ、例えば、ヒトの場合には、細胞をSV-40アデノウイルスベクターで形質転換すれば前述と同様の方法でヒト脾臓間質細胞株を樹立することが可能である〔J. Cell. Physiol., 148, 245 (1991)〕。

## 2) CF-1細胞の特性

前記の如くして細胞株として樹立されたCF-1細胞については、標準的な細胞化学的手法を用いてアルカリ・ホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、 $\alpha$ -ナフチルアセテイトエステラーゼおよびオイル・レッドOを検索すると共に下記のモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いて免疫酵素組織化学検索によりその特性を検討した: Mac I (Sero Tec. 社製)、第V I I I 関連抗原 (Dakopatts社製)、I型コラーゲン、I I I 型コラーゲンおよびフィブロンネクチン (Chemicon International社製)、貪食能はラテックス・ビーズ (粒子径: 1.09  $\mu$ m, Sigma) を用い、また、脂肪細胞への分化能は、25 cm<sup>2</sup> フラスコでコンフルエント培養後  $10^{-6}$  mol/l の燐酸ハイドロコルチゾン (Sigma社製) を添加し、4週間の培養で検討した。

その結果、CF-1細胞は、アルカリ・ホスファターゼ、第V I I I 因子関連抗原、Mac I および貪食能は陰性であったが、I型コラーゲン、I I I 型コラーゲンおよびフィブロンネクチンは陽性であった。CF-1細胞は、微かにリピッドを含むが、 $10^{-6}$  mol/l のハイドロコルチゾン存在下の4週間のコンフルエント培養によっても脂肪細胞には分化しなかった。これらのデータから、CF-1細胞は、前脂肪細胞、マクロファージおよび血管内皮細胞の特

徴を備えていないと云えることから、これらとは異なる間質細胞由来であることが明らかとなった。

### 3) CF-1細胞による造血幹細胞の維持

造血幹細胞がCF-1細胞によって維持されるか否かを検討するため、T i l l & M c C u l l o c hの方法によるCFU-S assay (脾コロニー形成法)を行なった。マウス10匹/群に900cGyを照射(MBR-1520R, Hitachi社製, 東京)した後、骨髓単核細胞(BM細胞)( $1.0 \times 10^5$  /head、 $5.0 \times 10^4$  /headまたは $2.5 \times 10^4$  /head)およびCF-1細胞( $1.0 \times 10^5$  /head)を静注し、12日目に脾臓内のコロニー数を算えてCFU-S (脾臓コロニー)とした。

その結果、骨髓単核細胞(BM細胞)とCF-1細胞とを放射線照射したマウスに同時に移植すると、いずれのBM細胞群についても脾コロニー数は、CF-1細胞を移植しなかったマウスに比し有意に増加し(1.4~1.8倍)、また、BM細胞とCF-1細胞とを同時に移植したマウスの移植後12日目の生存率は、BM細胞を単独移植したマウスよりも高く、死亡率が低下することから、造血幹細胞がCF-1細胞によって維持されることが明らかとなった。

## 実施例

### モノクローナル抗体の作製

#### 1) 感作抗原と免疫法

感作抗原として、前述の参考例で取得したCF-1細胞を用いて抗原感作を行った。細胞株は、10%牛胎児血清(FBS、三光純薬社製)、Iscove改変Dulbecco培地(IMDM)(Boehringer-Mannheim社製)を培地として使用し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で37℃の温度条件下で継代培

養を行った。

細胞は、1 mM EDTA、PBS 処理後、軽いピペッティングによって培養フラスコより回収した。この細胞を約  $1 \times 10^7$  個/ml の細胞数で 1 mM EDTA・PBS に懸濁し、浮遊させ、Wistar Imamich 系ラット（7 週令、♀、動物繁殖研究所）に免疫した。初回免疫には、約  $1 \times 10^7$  個/ml の細胞 1 ml をラット腹腔内に注射し、1 ヶ月後に  $1 \times 10^7$  個/ml の細胞 1 ml を追加免疫した。更に、1 ヶ月間隔にて  $1 \times 10^7$  個/ml の細胞 1 ml を数回追加免疫し、免疫されたラット抗体と CF-1 細胞との反応性を確認後、最終免疫として、 $1 \times 10^8$  個/ml の細胞 1 ml を免疫した。最終免疫 3 日後にラットを屠殺して脾臓を摘出した。

## 2) 細胞融合

1 匹のラットから摘出した脾臓を細切後、遊離した脾細胞を遠沈した後、IMDM 培地（Boehringer-Mannheim 社製）中に懸濁し、浮遊させ、十分に洗浄を行った。一方、マウス・ミエローマ細胞株 Sp2/0-Ag14 [Nature, 276, 269-270 (1978)] を、10% 牛胎児血清（FBS、三光純薬社製）を含有する IMDM（Boehringer-Mannheim 社製）培地にて培養して得た細胞を、同様に前記 IMDM 培地で洗浄後、その  $1 \times 10^8$  個と、前記脾細胞  $2 \times 10^8$  個とを遠心管に入れ混合し、ポリエチレングリコール 4000（半井化学社製）によって常法 [Clin. Exp. Immunol., 42, 458-462 (1980)] に従い細胞融合させた。

次いで、得られた融合細胞を、20% FBS を含む IMDM 培地にて 96 個のウェルプレートに分注し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 37℃ で培養した。翌日より HAT 選択培地に徐々に置換させて培養を続けた。

培養開始後、上清を週 2 回の頻度に、それぞれ新しい HAT 培地

に代え、培養を継続し、増殖維持させた。

次に、このようにして得られた融合細胞を常法により限界希釈法を用いてクローニングした。すなわち、前記融合細胞の培養上清中の抗体を利用して、感作抗原との結合性を調べ、感作抗原と強い結合性を有するクローンだけを常法により限界希釈法を用いてクローニングした。

### 3) スクリーニング

融合細胞（ハイブリドーマ）のスクリーニングは、フローサイトメトリー（Flow Cytometry）を使った間接蛍光抗体法により行った。

目的の抗体を産生するクローンのスクリーニングは、ターゲット細胞として、CF-1細胞を用いて行った。すなわち、反応バッファ（2% FBS, 0.02% NaN<sub>3</sub>を含むPBS）に懸濁した細胞を遠心し、ペレットとして回収した後、ハイブリドーマ培養上清100  $\mu$ l中に浮遊させ（約 $1 \times 10^6$ 個/100  $\mu$ l）、4℃にて1時間反応させた。前記バッファにより1回洗浄した後、FITC標識ヤギ抗ラットIgG（FC）抗体（Chemicon社製）を加えて1時間インキュベーションした。1回洗浄した後、フローサイトメトリー（Flow Cytometry）（FACS Scan, ベクトン・デッキンソン社製）にて解析した。

### 4) 抗体の精製

前記3)でスクリーニングした融合細胞を常法に従って培養し、培養上清中に産生される抗体を常法により分離し、精製した。

すなわち、各ウエルのうち前記感作抗原に対する抗体価の高かったウエルからハイブリドーマを採取し、組織培養プラスチックディッシュ（Corning社製）に広げて5% CO<sub>2</sub>中で37℃にて継代培養を行い、増殖させ、常法により精製することにより、モノクローナル抗体GSPST-1、BMAP-1を得た。

GSPST-1については、得られた細胞をプリスタン投与を施

行したBALB/cAJcl-nu系ヌードマウス（8週令，♂，日本クレア社製）に腹腔内注入した。10～14日後、産生された腹水を採取し、33%硫酸アンモニウムで塩析しPBSで透析した。また、BMAP-1抗体については、10%FBSを含むIscove modified MEM培地にて、大量培養し、培養上清を濃縮後、33%硫酸アンモニウムで塩析し、PBSで透析後、プロテインAカラムキット（アマシャム社製）により再度精製し、PBSにより透析を行った。尚、上記の実施例においては、感作抗原として、前記CF-1細胞を使用した場合について例示したが、  
5  
10 15 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 10755 10760 10765 10770 10775 10780 10785 10790 10795 10800 10805 10810 10815 10820 10825 10830 10835 10840 10845 10850 10855 10860 10865 10870 10875 10880 10885 10890 10895 10900 10905 10910 10915 10920 10925 10930 10935 10940 10945 10950 10955 10960 10965 10970 10975 10980 10985 10990 10995 11000 11005 11010 11015 11020 11025 11030 11035 11040 11045 11050 11055 11060 11065 11070 11075 11080 11085 11090 11095 11100 11105 11110 11115 11120 11125 11130 11135 11140 11145 11150 11155 11160 11165 11170 11175 11180 11185 11190 11195 11200 11205 11210 11215 11220 11225 11230 11235 11240 11245 11250 11255 11260 11265 11270 11275 11280 11285 11290 11295 11300 11305 11310 11315 11320 11325 11330 11335 11340 11345 11350 11355 11360 11365 11370 11375 11380 11385 11390 11395 11400 11405 11410 11415 11420 11425 11430 11435 11440 11445 11450 11455 11460 11465 11470 11475 11480 11485 11490 11495 11500 11505 11510 11515 11520 11525 11530 11535 11540 11545 11550 11555 11560 11565 11570 11575 11580 11585 11590 11595 11600 11605 11610 11615 11620 11625 11630 11635 11640 11645 11650 11655 11660 11665 11670 11675 11680 11685 11690 11695 11700 11705 11710 11715 11720 11725 11730 11735 11740 11745 11750 11755 11760 11765 11770 11775 11780 11785 11790 11795 11800 11805 11810 11815 11820 11825 11830 11835 11840 11845 11850 11855 11860 11865 11870 11875 11880 11885 11890 11895 11900 11905 1

図 1 ～ 図 3 から明らかなとおり、モノクローナル抗体 G S P S T - 1、B M A P - 1 は C F - 1 細胞に対して結合性を有しており、C F - 1 細胞の表面抗原を認識するものであることが分った。

(骨髄細胞に対する反応性)

- 5 次に、G S P S T - 1、B M A P - 1 の正常の骨髄細胞に対する反応性をフローサイトメトリー (F l o w C y t o m e t r y) (F A C S c a n, ベクトン・デッキンソン社製) により検討した結果を図 4 ～ 図 6 に示す。ここで、図 4 は、抗体非存在下のコントロール、図 5 は、G S P S T - 1 と骨髄細胞との結合性、図 6 は、  
10 B M A P - 1 と骨髄細胞との結合性、の解析結果を示す。尚、図中、縦軸は相対細胞数を、横軸は蛍光強度を、示す。

図 4 ～ 図 6 に示すように、G S P S T - 1 は、骨髄細胞とは全く結合せず、B M A P - 1 は、すべての骨髄細胞と結合することが明らかとなった。

- 15 (骨髄性白血病細胞株 (N F S - 6 0) に対する反応性)

- G S P S T - 1 および B M A P - 1 の N F S - 6 0 細胞 (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 2 , 6 6 8 7 - 6 6 9 1 ( 1 9 8 5 ) ) に対する反応性をフローサイトメトリー (F l o w C y t o m e t r y) (F A C S c a n, ベクトン・デッキンソン社製) により検討した結果を図 7 ～ 図 1 0 に示す。ここで、図 7 は、抗体非存在下のコントロール、図 8 は、G S P S T - 1 と N F S - 6 0 細胞との結合性、図 9 は、市販のラット I g G 1 ( Z y m e d 社製) を用いたコントロール、図 1 0 は、B M A P - 1 と N F S - 6 0 細胞との結合性の解析結果を示す。尚、図中、縦軸  
25 は相対細胞数を、横軸は蛍光強度を、示す。

図 7 ～ 図 1 0 に示すように、G S P S T - 1 は、N F S - 6 0 細胞とは反応せず、B M A P - 1 は、N F S - 6 0 細胞と結合することが明らかとなった。

(B M A P - 1 の N F S - 6 0 細胞に対する細胞増殖抑制試験)

BMAP-1のNFS-60細胞に対する作用を、G-CSF 100 ng/ml およびサイクロヘキシミド  $10^{-9}$  M存在下にて、MTTアッセイ法により検討した結果を図11に示す。96穴の培養プレートを用い、NFS-60細胞を  $4 \times 10^3$  /well/100  $\mu$ l に対し、BMAP-1は0, 1, 10, 100 ng/ml, 1, 10  $\mu$ g/ml 濃度のものをそれぞれ10  $\mu$ l/well添加し、その2日後に、MTT法により生細胞数を測定した。その結果、図11に示すように、NFS-60細胞はBMAP-1により著しく増殖が抑制されていることが明らかとなった。

#### 10 ②抗体のタイピング

次に、得られたモノクローナル抗体のIgGのサブクラスをタイピングしたところ〔ラットMono Ab-ID・Spキット（Zymed社製）、およびビオチン標識マウス抗ラットIgG1抗体（Zymed社製）を使用〕、GSPST-1はIgG2a、BMAP-1はIgG1であることが明らかとなった。

#### ③骨髄移植阻害作用

次に、これらの抗体を用いて骨髄移植阻害実験を行い、その特性について検討した。その結果を図12～図13に示す。図12～図13に示されるように、BMAP-1は、骨髄移植阻害効果を有するが、GSPST-1には、その効果は認められなかった。すなわち、致死量の放射線照射（900 cGy）をしたC57BL/6Jマウスに、 $1.0 \times 10^5$  /headの骨髄細胞およびモノクローナル抗体を、尾静脈より投与し、脾臓コロニーの形成を観察したところ、上記の結果を得た。尚、図13のNon-treatedは、これらを投与しなかった場合を示す。

図13に示されるように、BMAP-1が、骨髄移植阻害実験において、移植を完全に抑制するのは、このモノクローナル抗体が、骨髄細胞に反応しアポトーシスを引き起こすことに因るものであることが確認された。すなわち、BMAP-1産生のハイブリドーマ

をヌードマウスに腹腔内投与すると腹水がわずかに貯留する時期にマウスは死亡した。また、正常のC57BL/6Jマウスに、 $50 \mu\text{g}/\text{head}$ のBMAP-1を静脈内投与することにより骨髓細胞がすべて死滅することが判明し、図14にBMAP-1静脈内投与6日後の骨髓細胞が死滅したことを裏付ける顕微鏡写真を示した。この顕微鏡写真から明らかなように、リンパ球ばかりでなく、好中球、巨核球、骨髓芽球、骨髓球、肥満細胞、マクロファージ、単球、赤芽球等（いわゆる骨髓球様細胞）が死滅していることが確認された。また、 $30 \mu\text{g}/\text{head}$ のBMAP-1を投与したマウスの骨髓細胞のDNAを検討したところ、図15に示すように、明らかにラダー・フォーメーションが認められ、BMAP-1の骨髓細胞に対する前記反応は、アポトーシスに因るものであることが確認された。

なお、BMAP-1抗体について、そのIgGのFc領域をペプシン（Sigma社製）により切断し、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ としてGPCカラムにより精製した後、C57BL/6Jマウスにその $33.5 \mu\text{g}/\text{head}$ （完全なIgGの $50 \mu\text{g}/\text{head}$ に相当する量）を静脈内投与した結果、骨髓において、骨髓細胞が死滅することが認められた。このことにより、BMAP-1による骨髓細胞の死滅には、抗体依存性細胞障害および補体依存性細胞障害は関与していないことが明らかとなった。

ところで、アポトーシスを引き起こす抗原としては、細胞表面蛋白質のFas抗原が既に報告されているが、このFas抗原は、胸腺、心臓、肝臓、肺、卵巣などでmRNAの発現が認められているが、骨髓ではそのmRNAがほとんど検出されないことから〔J. Immunol., 148, 1274-1279 (1992)〕、BMAP-1が認識する抗原は、従来知られているFas抗原とは異なるものであることは明らかである。

更に、BMAP-1が認識する抗原が、TNFレセプターか否か

を明らかにするため、TNFに反応し細胞死を起こすL-929細胞を用い、BMAP-1の作用を検討した。マウスTNF $\alpha$  (Genzyme社製)の最終濃度は、0, 1, 10, 100 pg/ml, 1, 10, 100 ng/ml, 1  $\mu$ g/mlとし、BMAP-1  
5 の最終濃度は、0, 10, 100 pg/ml, 1, 10, 100 ng/ml, 1, 10  $\mu$ g/mlとし、TNF $\alpha$ およびBMAP-1  
添加後2日目に、L-929細胞の生細胞数をMTT法により測定した。その結果、図16、17に示すように、TNF $\alpha$ によりL-929細胞は著明に減少するのに対し、BMAP-1はL-929  
10 細胞に対し作用を及ぼさなかった。従って、BMAP-1が認識する抗原はTNFレセプターでないことが明らかとなった。

BMAP-1が認識する抗原が、MHC class I抗原であるか否かをフローサイトメトリー (Flow Cytometry) (FACSscan, ベクトン・デッキンソン社製)により検討した  
15 結果を図18～図21に示す。ここで、図18は、市販のラットIgG2a (Zymed社製)を用いたコントロール、図19は、抗マウスMHC class I抗体 (ラットIgG2a, BMA社製)とBWV1細胞 (BW5147細胞由来のマウスリンパ腫)との結合性、図20は、市販のラットIgG1 (Zymed社製)を用い  
20 たコントロール、図21は、BMAP-1とBWV1細胞との結合性の解析結果を示す。尚、図中、縦軸は相対細胞数を、横軸は蛍光強度を、示す。その結果、BMAP-1はBWV1細胞を認識しないが、MHC class I抗体は、BWV1細胞と反応した。

以上のように、BMAP-1は、骨髓球様細胞にアポトーシスを  
25 引き起こす作用を有するものであることが実験的に確認されたが、本発明者の知るところによれば、前述の如く、従来、骨髓球様細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体について報告された例はなく、かかる作用を有するモノクローナル抗体は、本発明者が見い出したものである。

前記 BMAP-1 が認識する抗原については、直接発現クローニング (Direct Expression Cloning) によりマウス IAP であることが明らかとなった。次に、BMAP-1 の作用をマウス IAP を遺伝子導入した組み換え体細胞を用いて  
5 検討した。すなわち、マウス IAP (Integrin Associated Protein) を発現して無い Jurkat 細胞 (Jurkat Cell) に常法により IAP 遺伝子を導入し、マウス IAP を発現している細胞 (Recombinant Jurkat Cell) を用い、BMAP-1 の当該 IAP 発現細胞  
10 に対する作用を MTS 法およびフローサイトメトリーによる DNA 断片化の検索により検討した。その結果を図 22~26 に示す。

MTS 法は生細胞数を測定するアッセイ法 (プロメガ社) であり、この方法により BMAP-1 の組み換え体 Jurkat 細胞への作用を検討した。すなわち、96 穴の培養プレートを用い、G418 (1 mg/ml 最終濃度) (ギブコ BRL 社製) の存在下で、組  
15 み換え体 Jurkat 細胞を  $1 \times 10^4$  /well / 100  $\mu$ l に対し、BMAP-1 を最終濃度で 1、10、100 ng/ml および 1、10  $\mu$ g/ml、対照として IgG1 を 10  $\mu$ g/ml 添加し、2 日間培養後に、MTS 法により生細胞数を測定した。その結  
20 果、図 22 に示すように、組み換え体 Jurkat 細胞は BMAP-1 により著しく増殖が抑制されていることが明らかとなった。

BMAP-1 による組み換え体 Jurkat 細胞の DNA 断片化の解析は、フローサイトメトリー (EPICS (登録商標) XL-MCL、コールター社製) を用いて行った。すなわち、6 穴の培  
25 養プレートを用い G418 (1 mg/ml 最終濃度) (ギブコ BRL 社製) の存在下で、組み換え体 Jurkat 細胞を  $1.5 \times 10^5$  /well / 3 ml に対し、IgG1 および BMAP-1 を最終濃度 1  $\mu$ g/ml 添加し 2 日間培養後、測定に供した。細胞を培養プレートより回収し 200  $\times$  g で細胞ペレットを 2 ml の冷 70 %

エタノール中に 4℃で 60 分間固定した。次いで、細胞を遠心し、1 ml の PBS 中に再懸濁した。0.5 ml の細胞サンプルに対して 0.5 ml の RNAse (Type I-A, Sigma, St. Louis, MO, USA, 1 mg/ml in PBS) を加え、次いで、1 ml のヨウ化プロビジウム (PI, Sigma, 100  $\mu$ g/ml in PBS) 溶液に混合した。混合した細胞は暗所で室温にて 15 分間インキュベーションした後、4℃の暗所に保持し、フローサイトメトリーによる測定に供した。

その結果、図 26 に示すように、マウス IAP 遺伝子を導入した細胞は BMAP-1 によりアポトーシスが誘起されていることが明らかとなった。

一方、発現 Vector のみを導入しマウス IAP を発現して無い Jurkat 細胞に対しては、BMAP-1 の上記の作用は見られなかった (図 24)。これらのことから、BMAP-1 抗体が認識する抗原は、IAP と同一であること、また、IAP がアポトーシスに関する機能を有することが明らかとなった。

現時点での情報では、IAP の機能としては、インテグリンの  $\alpha_v\beta_3$  の  $\beta$  鎖に結合し  $\alpha_v\beta_3$  とそのリガンド (Ligand) であるビトロネクチン (Vitronectin) との結合を支持する作用 (J. Cell. Biol., 123, 485-496 (1993))、好中球と血管内皮との接着に際し血管内皮に  $Ca^{2+}$  の流入を誘導する作用 (J. Biol. Chem., 268, 19931-19934 (1993))、あるいは好中球が血管内皮を通過することを支持する作用が報告されているが (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3978-3982 (1995))、アポトーシスに関する機能は報告されていない。

BMAP-1 は、上記のように、骨髓球様細胞と結合し、骨髓球細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体の一種であることから、当該 BMAP-1 抗体が特異的に認識する抗原としての I

A Pを発現している細胞を利用すれば、骨髄球様細胞等にアポトーシスを引き起こす物質を識別、同定し、スクリーニングすることが可能となる。

以上のように、本発明は、BMAP-1抗体が認識する抗原は、  
5 IAPと同一であること、また、IAPがアポトーシスに関する機能を有すること、を明らかとしたものであり、かかる知見に基づいて、IAP遺伝子を導入した細胞あるいはIAPを発現している細胞を用いることにより、骨髄球様細胞等にアポトーシスを誘起する物質を簡便かつ高効率にスクリーニングする方法を確立したものである。  
10

そして、本発明のスクリーニング方法によって取得されたモノクローナル抗体、その断片、IAPに結合能を有するアポトーシスを誘起する物質等の物質の骨髄球様細胞等に対するアポトーシス作用を利用することにより、当該モノクローナル抗体等の物質は、例え  
15 ば、その抗原の発現が高いと考えられる骨髄性白血病細胞を死滅させることが可能であると考えられることから、前記骨髄球様細胞にアポトーシスを誘起するモノクローナル抗体、その断片等の物質は、抗ガン剤、骨髄性白血病治療薬剤等の医薬組成物の有効成分として有用なものである。

20 以上、本発明のスクリーニング方法について実施例を示して具体的に説明したが、本発明で云うところのアポトーシスを誘起する物質は、前記具体例として例示したものが代表的なものとしてあげられるものの、必ずしもこれに限定されるものではなく、同様にスクリーニングされた同様の特性および機能を有するすべての物質を包  
25 含するものであることは云うまでもない。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、IAPを発現している細胞を用いることにより、骨髄球様細胞にアポトーシスを引き起こす抗体等の物質を、その特異的

結合反応を利用して、それらを識別、同定し、簡便かつ高効率でスクリーニングすることを可能とする。本発明のスクリーニング方法により取得された骨髓球様細胞等にアポトーシスを引き起こす作用を有する物質は、その特性を利用して、抗ガン剤、骨髓性白血病の  
5 治療等の分野において有用な骨髓性白血病治療薬剤等の医薬組成物の有効成分として使用し得るものである。

寄託された微生物への言及

寄託機関の名称及びあて名：通商産業省工業技術院生命工学工  
10 業技術研究所（あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番  
3号（郵便番号305）

寄託した日付：1993年8月9日

受託番号：FERM BP-4382

微生物の表示：BMAP-1（ラット マウス ハイブリドマ）  
15

20

25

## 請求の範囲

1. I A P ( I n t e g r i n A s s o c i a t e d  
P r o t e i n ) を発現している細胞を用いてアポトーシス ( a  
5 p o p t o s i s ) を誘起する性質を有する物質を探索することを  
特徴とするアポトーシスを誘起する物質のスクリーニング方法。
2. 細胞が、骨髓球様細胞である請求項 1 記載のスクリ  
ーニング方法。
3. 請求項 1 または請求項 2 記載のスクリーニング方法  
10 で得られるアポトーシスを誘起する物質。
4. アポトーシスを誘起する物質が抗体であるところの  
請求項 3 記載の物質。
5. 請求項 3 および／または請求項 4 記載の物質を有効  
成分としてなる医薬組成物。
- 15 6. 医薬組成物が抗ガン剤であるところの請求項 5 記載  
の医薬組成物。
7. 医薬組成物が骨髓性白血病治療薬剤であるところの  
請求項 5 記載の医薬組成物。
8. I A P に結合能を有するアポトーシスを誘起する物  
20 質。
9. 請求項 8 記載の物質を有効成分としてなる医薬組成  
物。
10. 医薬組成物が抗ガン剤であるところの請求項 9 記載  
の医薬組成物。
- 25 11. 医薬組成物が骨髓性白血病治療薬剤であるところの  
請求項 10 記載の医薬組成物。

1 / 17

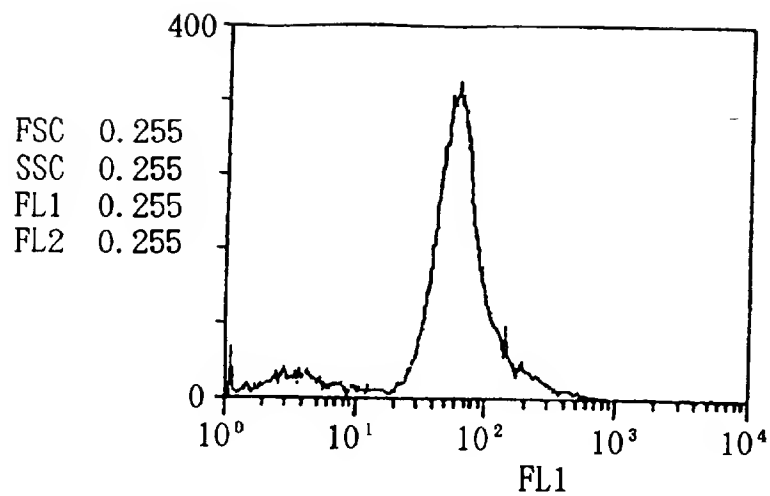


図 1

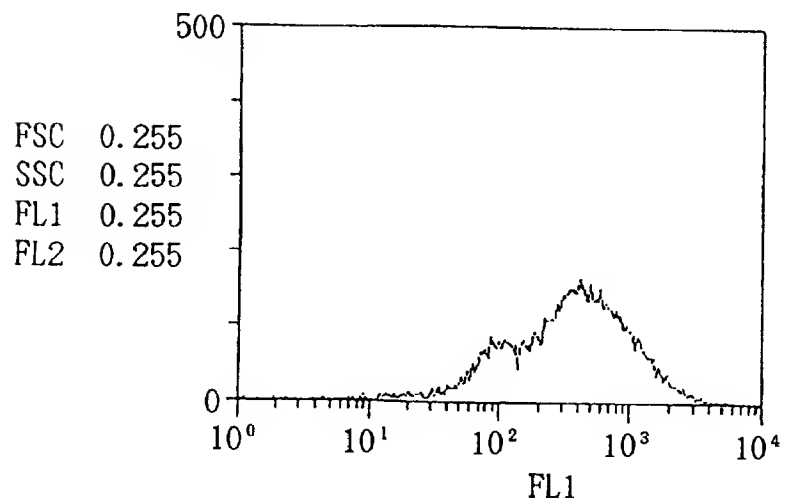


図 2

2 / 17

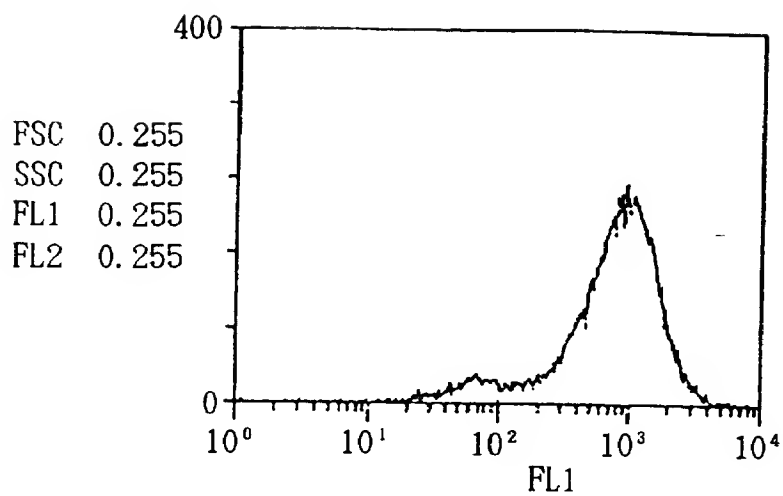


図 3

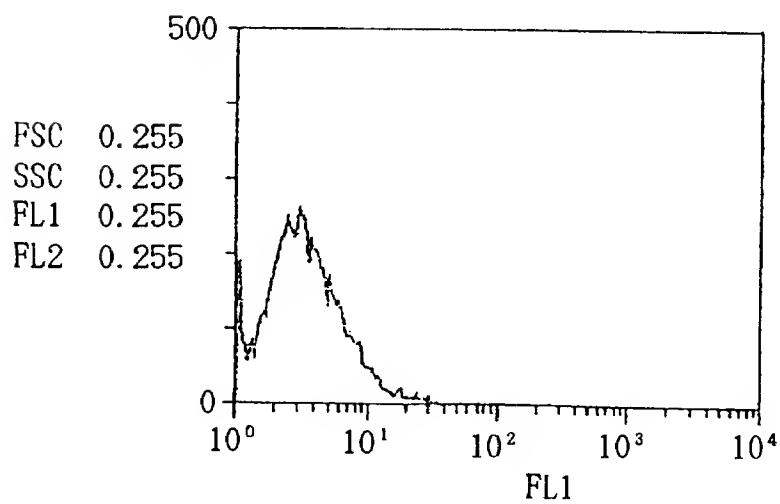


図 4

3 / 17

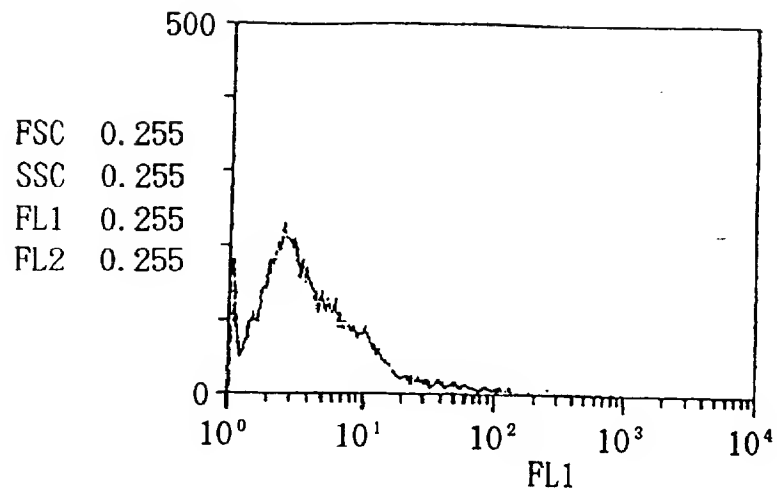


図 5

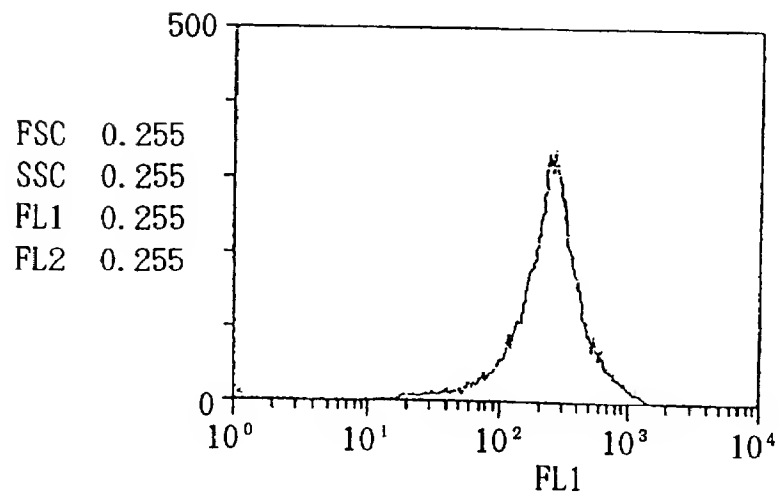


図 6

4 / 17

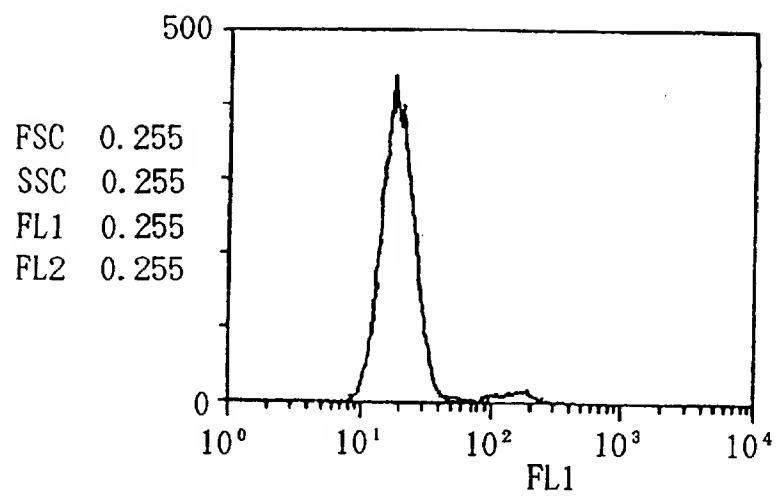


図 7

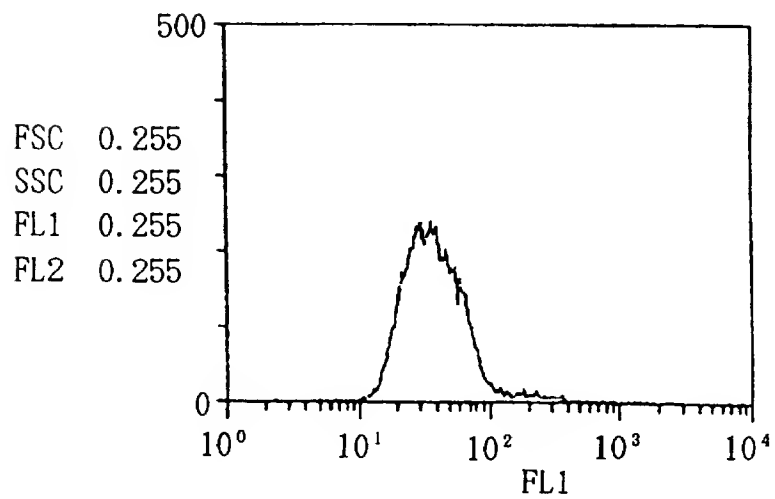


図 8

5 / 17

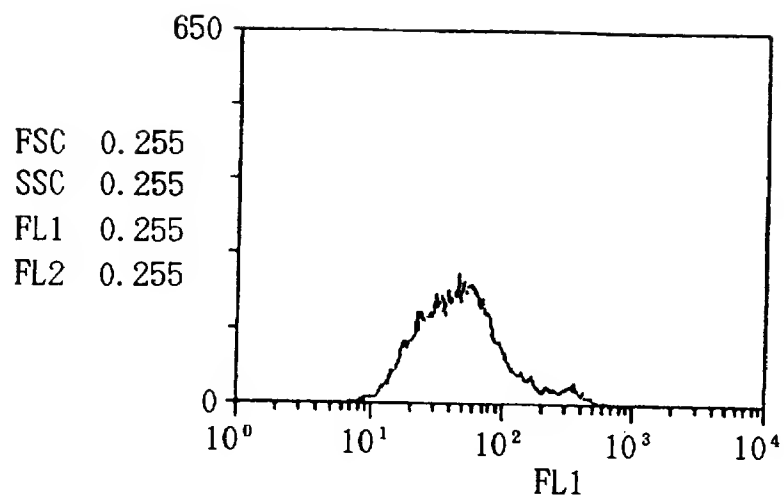


図 9

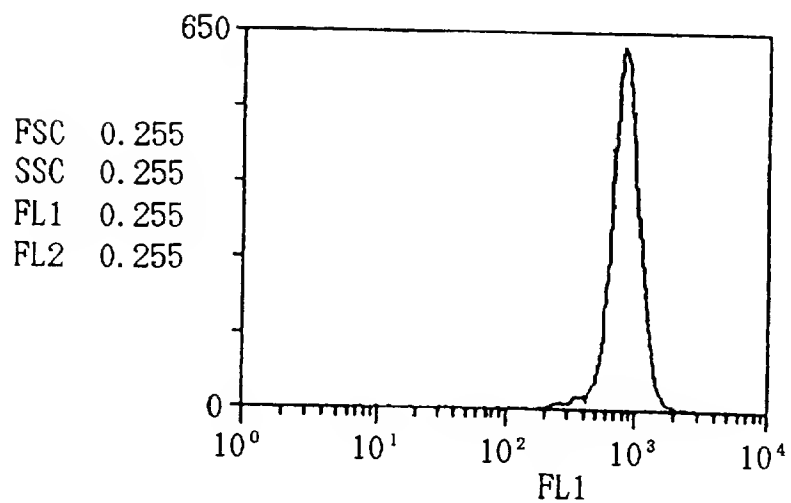
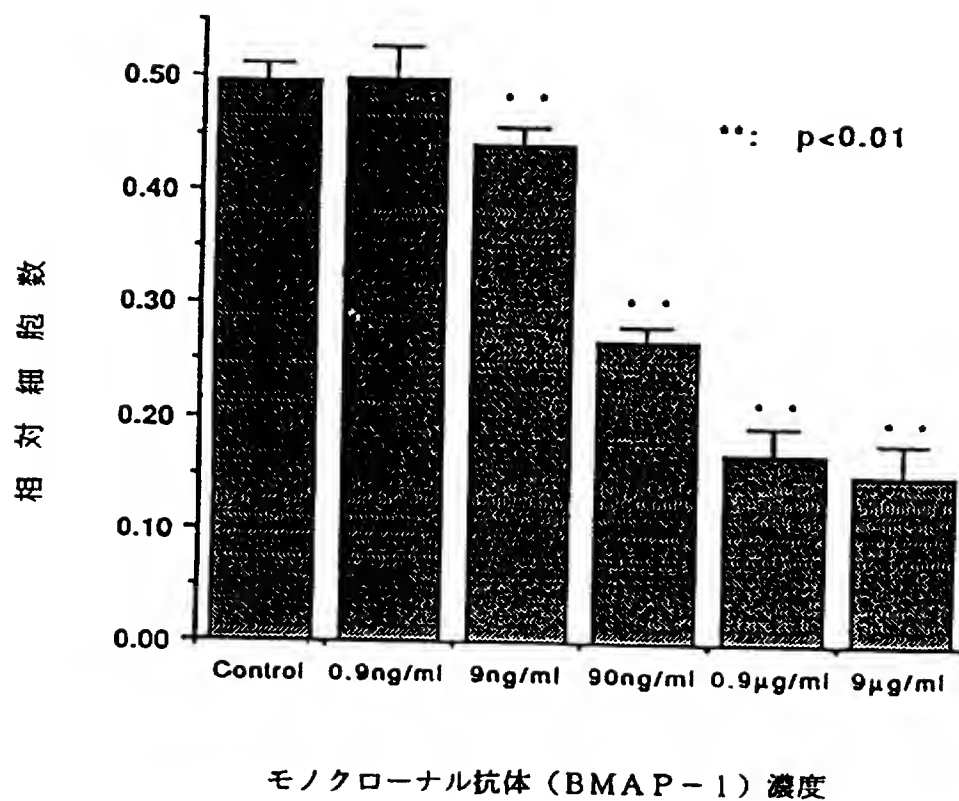


図 10

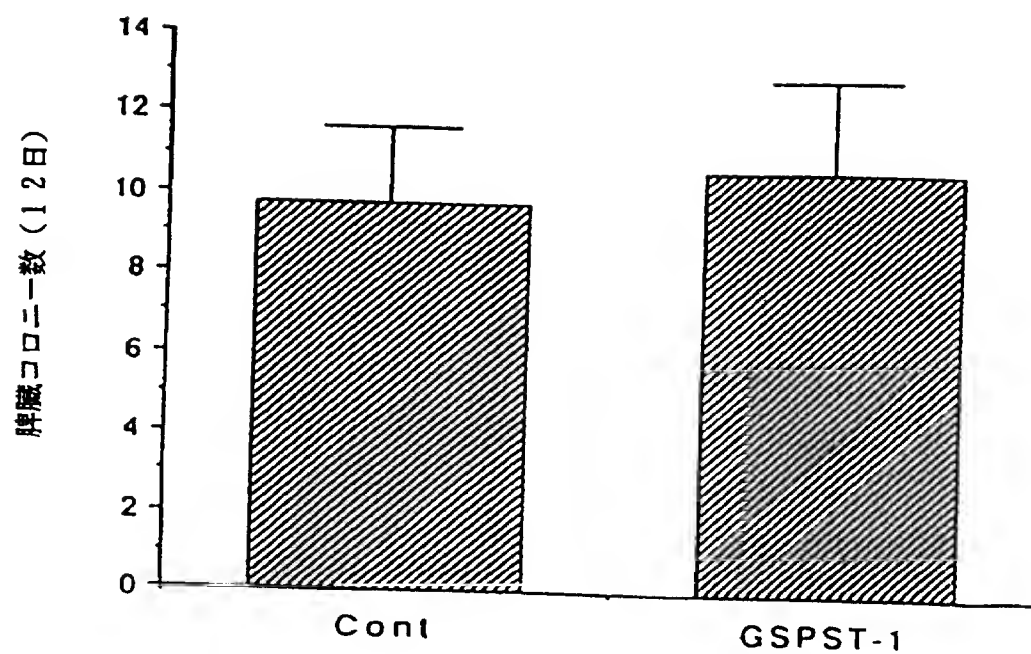
6 / 17



BMAP-1のNFS-60に対する細胞増殖抑制試験

図11

7/17

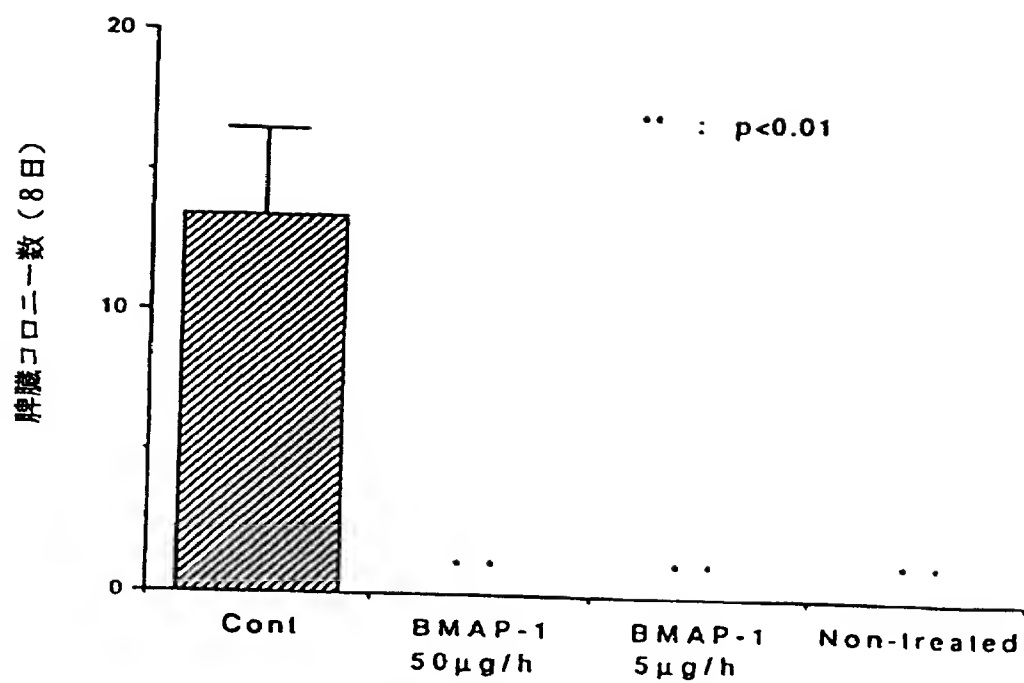


モノクローナル抗体

骨髄移植阻害試験

図12

8 / 17

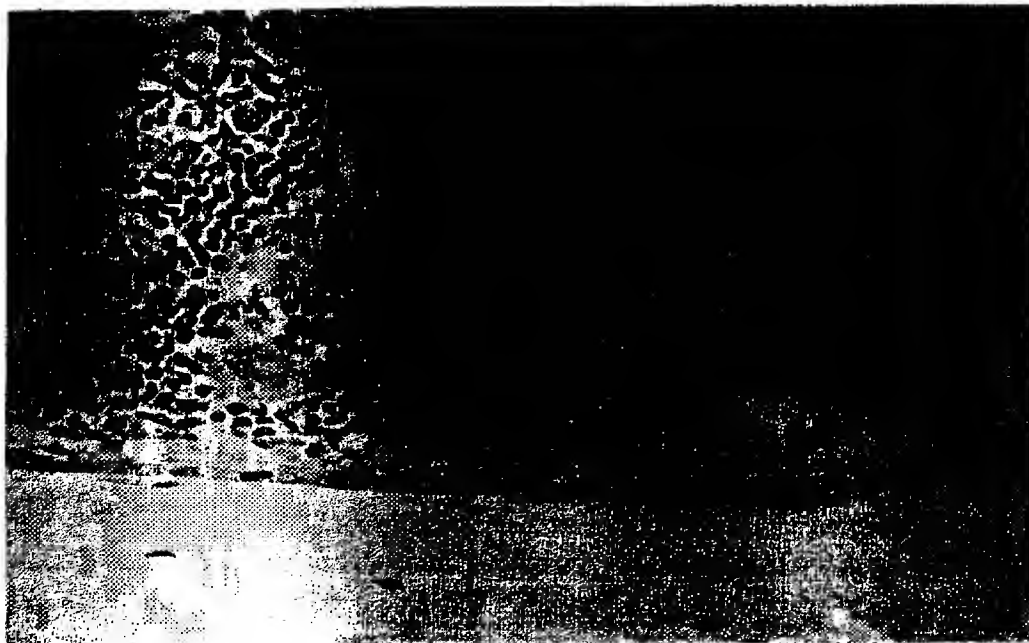


モノクローナル抗体

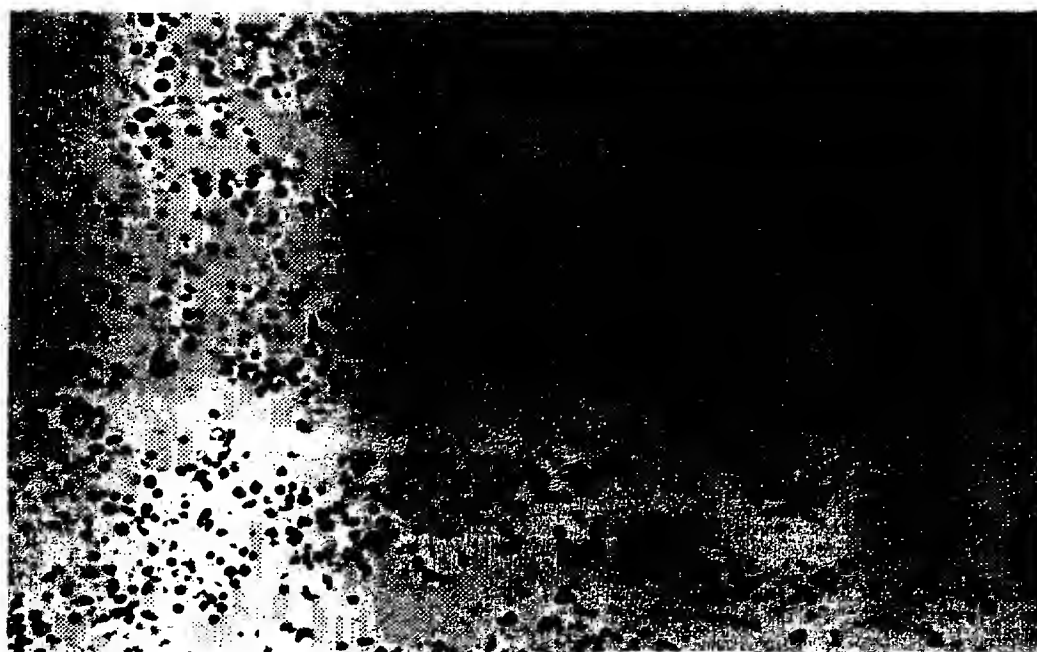
骨髄移植阻害試験

図13

9 / 17



(1)



(2)

10/17

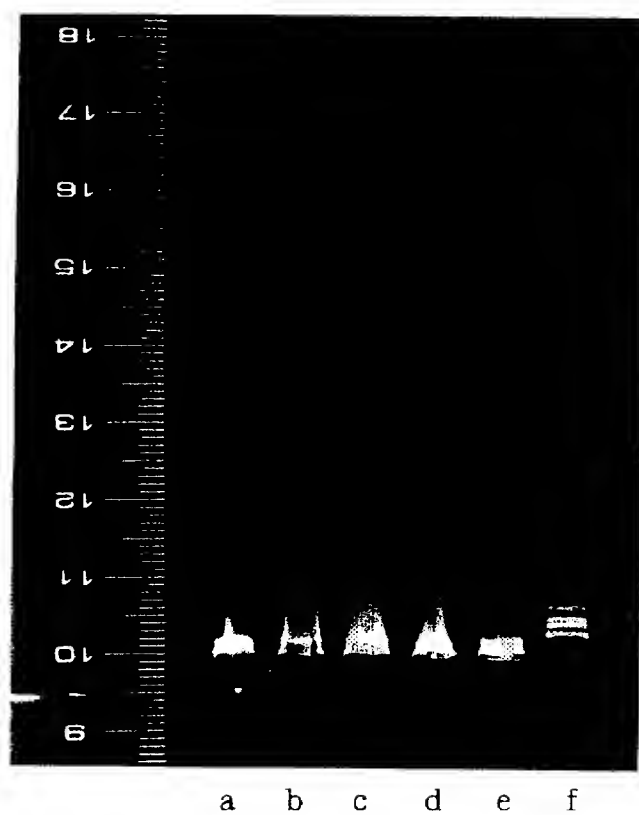
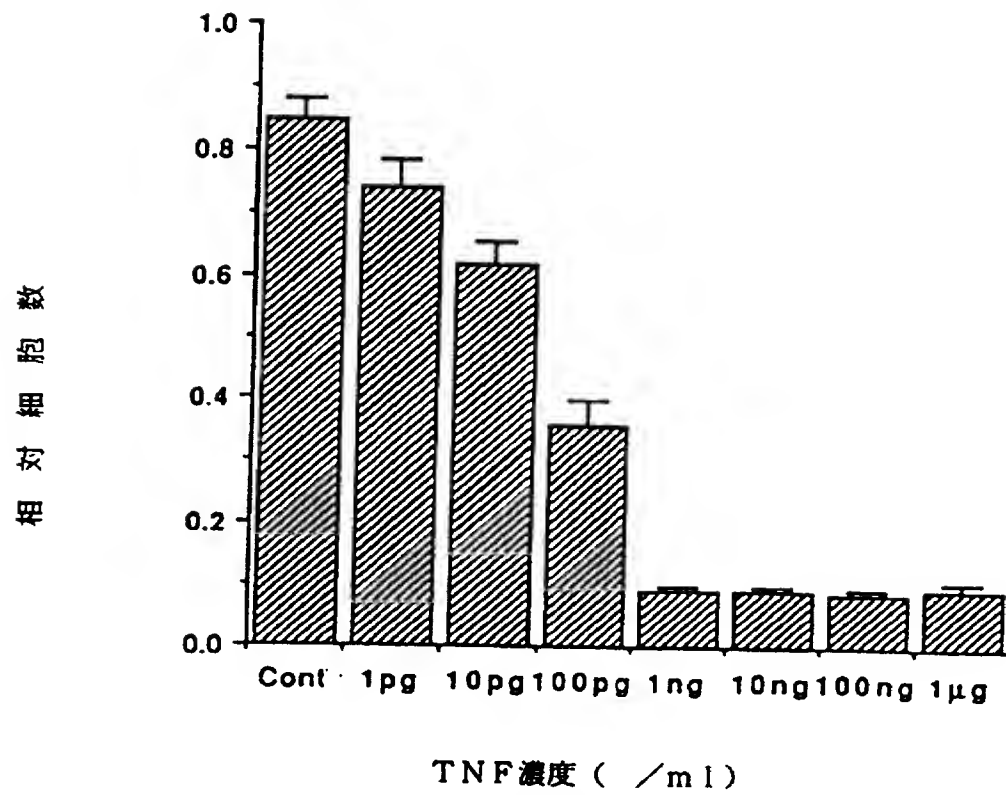


図 15

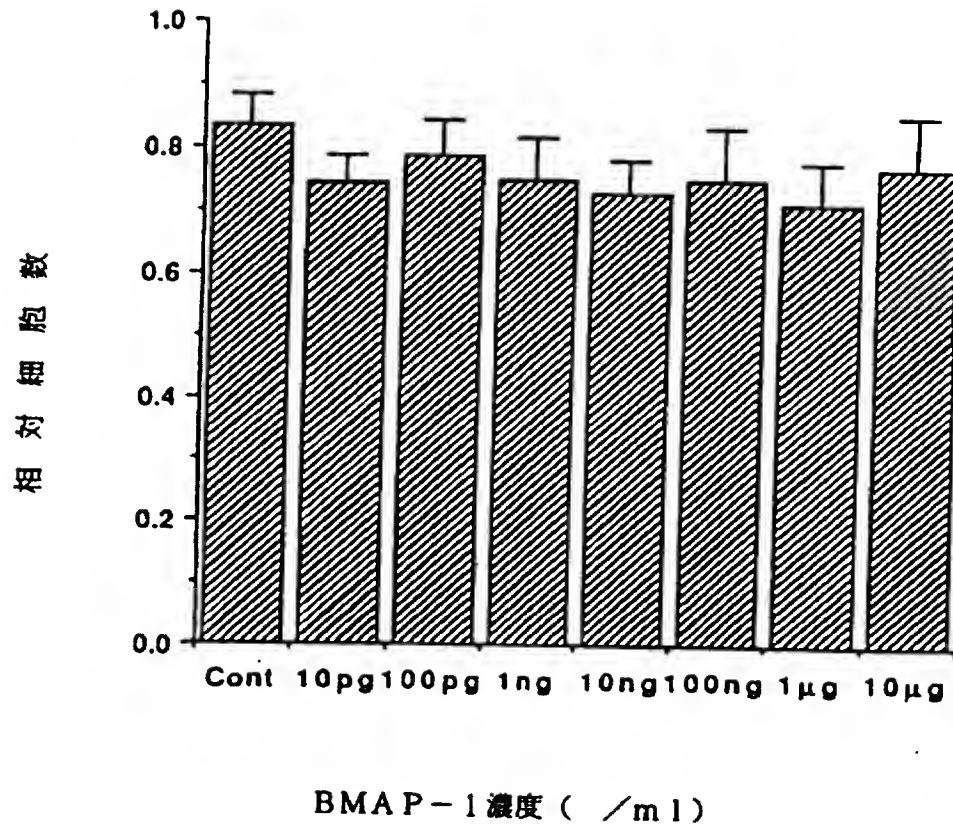
11/17



TNFのL-929に対する細胞障害試験

図16

12/17



BMAP-1 の L-929 に対する細胞障害試験

図 17

13 / 17

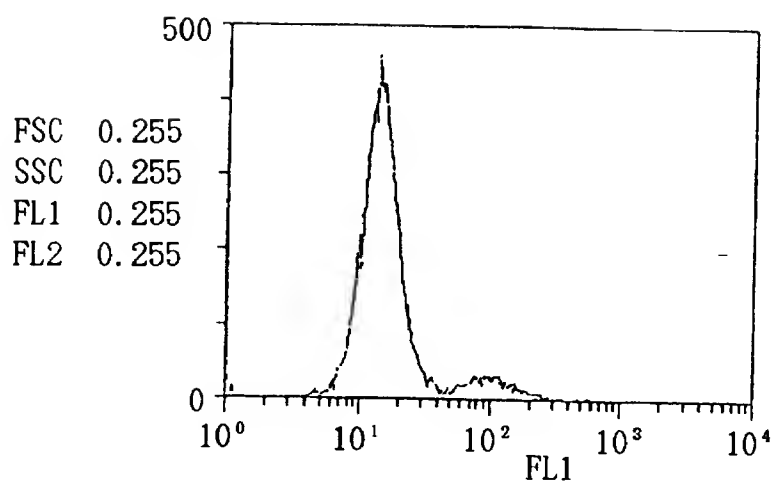


図 18

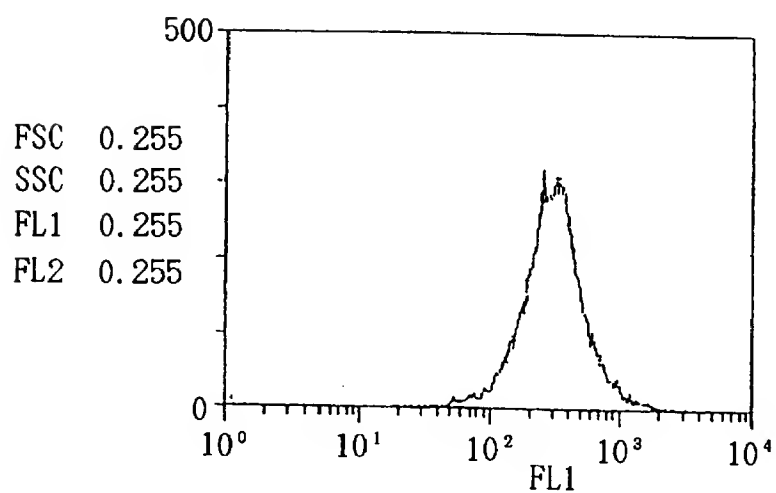


図 19

14 / 17

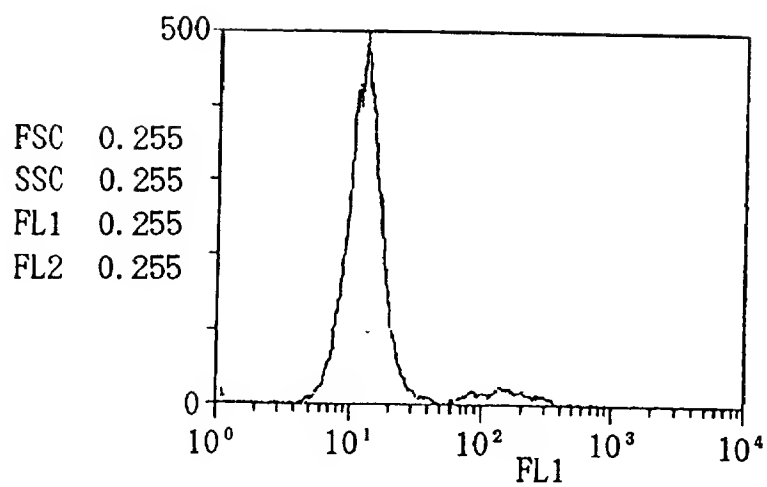


図 2 0

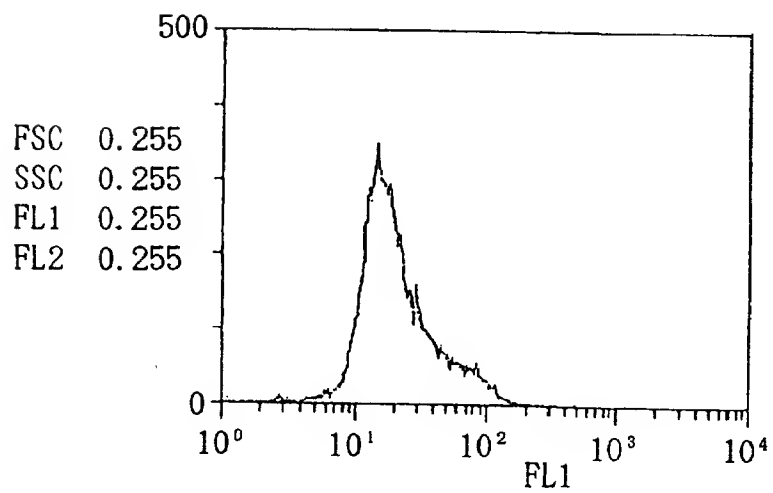
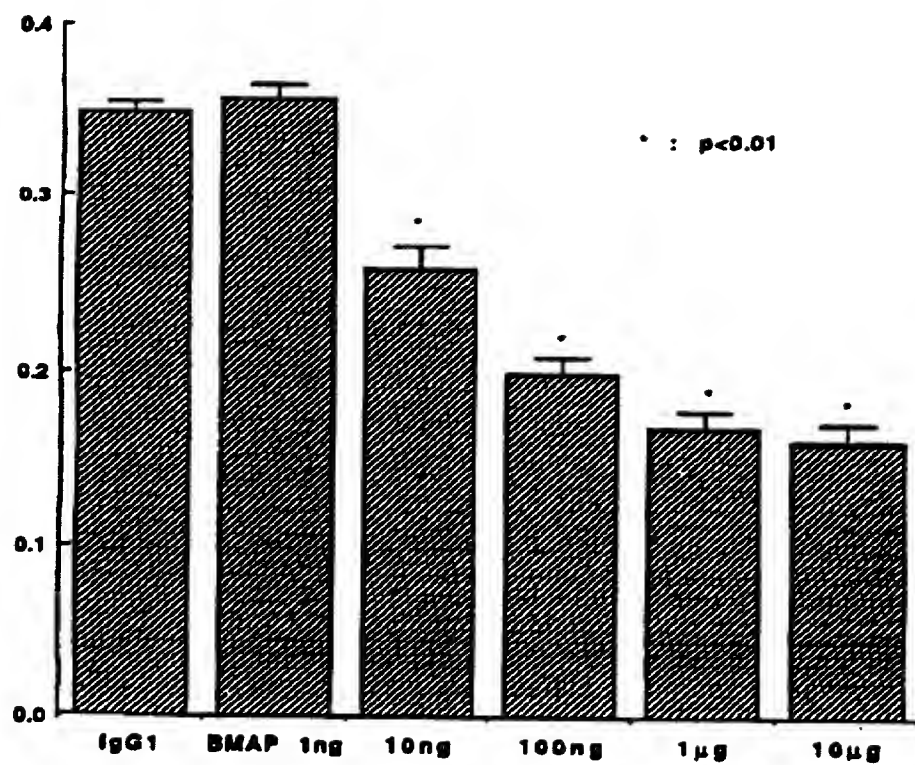


図 2 1

15/17



BMAP-1濃度 (／ml)

BMAP-1の細胞 (マウスIAP遺伝子を導入した  
ジャーカット細胞) に対する増殖抑制作用

図22

16 / 17

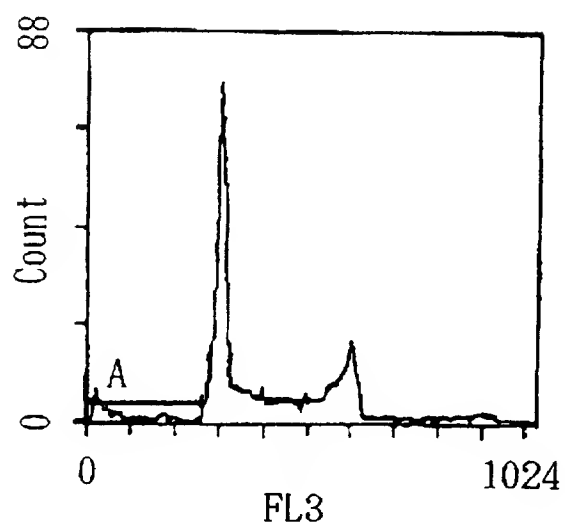


図 2 3

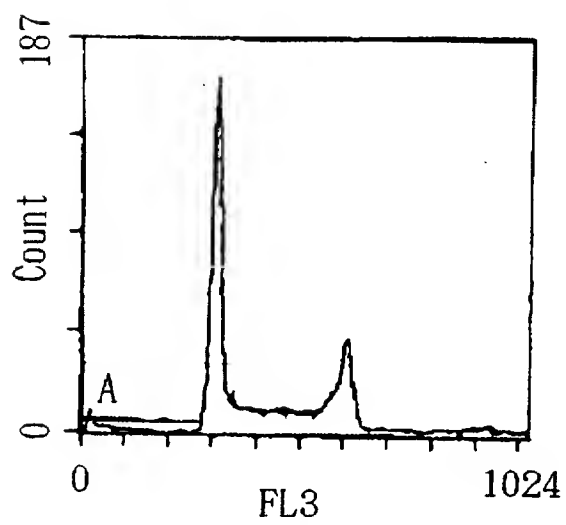


図 2 4

17 / 17

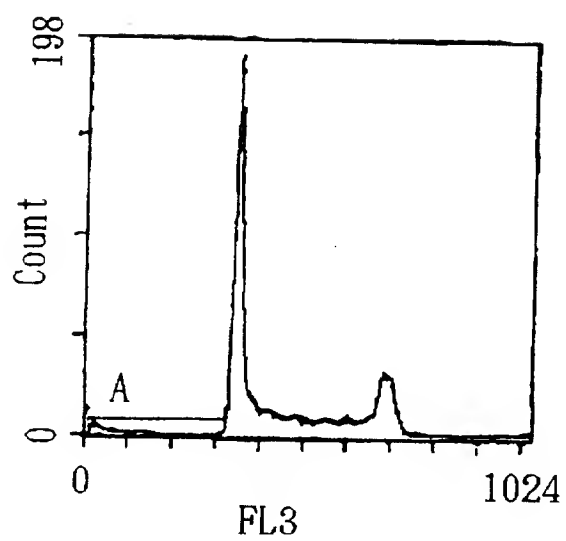


図 2 5

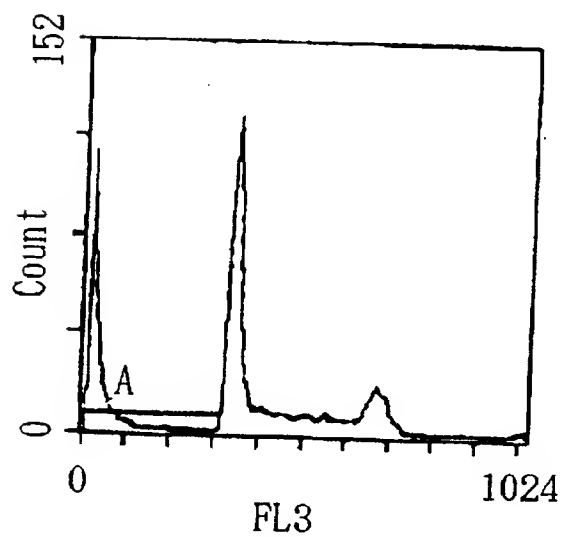


図 2 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00702

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> A61K39/395, G01N33/15//C07K16/28, C12N15/06, C12P21/08,  
(C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> A61K39/395, G01N33/15//C07K16/28, C12N15/06, C12P21/08,  
(C12P21/08, C12R1:91)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 95/06748, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), March 9, 1995 (09. 03. 95) & EP, 721015, A	1 - 7
Y	ROSALES, Carlos et al., "EXPRESSION OF THE 50-kDa INTEGRIN-ASSOCIATED PROTEIN ON THE MYELOID CELLS AND ERYTHROCYTES", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1992, Vol. 149, No. 8, pp. 2759-2764	1 - 11
Y	BROWN, Eric et al., "Integrin-associated Protein: A 50-kD Plasma Membrane Antigen Physically and Functionally Associated with Integrins", The Journal of Cell Biology, 1990, Vol. 111, No. 6, pp. 2785-2794	1 - 11
Y	DEDHAR, Shoukat, "Integrin mediated signal transduction in oncogenesis: An overview", Cancer and Metastasis Reviews, 1995, Vol. 14, pp. 165-172	1 - 11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 16, 1997 (16. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

May 27, 1997 (27. 05. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>4</sup> A61K39/395, G01N33/15//C07K16/28, C12N15/06, C12P21/08, (C12P21/08, C12R1:91)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>4</sup> A61K39/395, G01N33/15//C07K16/28, C12N15/06, C12P21/08, (C12P21/08, C12R1:91)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 95/06748, A1 (中外製薬株式会社) 9. 3月. 1995 (09. 03. 95) & EP, 721015, A	1-7
Y	ROSALES, Carlos et al, "EXPRESSION OF THE 50-kDa INTEGRIN-ASSOCIATED PROTEIN ON THE MYELOID CELLS AND ERYTHROCYTES", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1992, Vol. 149, No. 8, pp. 2759-2764	1-11
Y	BROWN, Eric et al, "Integrin-associated Protein: A 50-kD Plasma Membrane Antigen Physically and Functionally Associated with Integrins", The Journal of Cell Biology, 1990, Vol. 111, No. 6, pp. 2785-2794	1-11
Y	DEDHAR, Shoukat, "Integrin mediated signal transduction in oncogenesis: An overview", Cancer and Metastasis Reviews, 1995, Vol. 14, pp. 165-172	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 05. 97

国際調査報告の発送日

27.05.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬戸下 浩一



4C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3453